

氏名（本籍）	ひらた なおと 平田 尚人（神奈川県）		
学位の種類	博士（薬学）		
学位記番号	論博第324号		
学位授与の日付	平成 25 年 7 月 10 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
学位論文題目	DBA/2 マウスにおける致死的CAWS血管炎の発症機序に関する研究		
論文審査委員（主査）	教授	大野	尚仁
	教授	野口	雅久
	教授	田野中	浩一
	教授	畠崎	榮

論文内容の要旨

世界保健機関（WHO）の統計では、2008 年の全世界における死因の上位は、虚血性心疾患（12.8%）と脳血管障害（10.8%）となっており、循環器系疾患は全人類にとっての脅威である。これら循環器系疾患の病因研究をはじめとして、治療法および新規薬物の開発、治療プロトコルの検討では、基礎的研究と前臨床段階での優れた動物モデルを用いた解析が不可欠である。

川崎病患者の糞便中から分離された病原性真菌 *Candida albicans* 菌体抽出成分（CADS）が川崎病に類似したマウスの冠狀動脈炎を起こすことが 1987 年に報告され、病態モデルとして着目された。さらに、*C. albicans* の培養上清から得られる可溶性多糖画分（*Candida albicans* water soluble fraction; CAWS）にも類似の活性が見出され（CAWS 血管炎）、中でも DBA/2 マウスに対して、著しく強い血管炎誘発作用と致死毒性があることが報告された。CAWS 血管炎は川崎病に代表される血管炎の動物モデルとして解析されてきたが、DBA/2 マウスのみに認められる強力な致死毒性および血管炎の発症機序については未だ十分に解析されておらず、不明な点が多く残されていた。

本研究では、DBA/2 マウスにおける致死的 CAWS 血管炎の病態と発症機序について検討するため、病理組織学的視点（第 1 章）ならびに、循環器系疾患モデルとしての視点（第 2 章）から解析を行った。さらに、CAWS の活性本体であるマンナン構造の特徴、および糖鎖構造と血管炎発症の構造活性相関（第 3 章）について検討した。

第 1 章 DBA/2 マウスにおける CAWS 血管炎の病理組織学的特徴

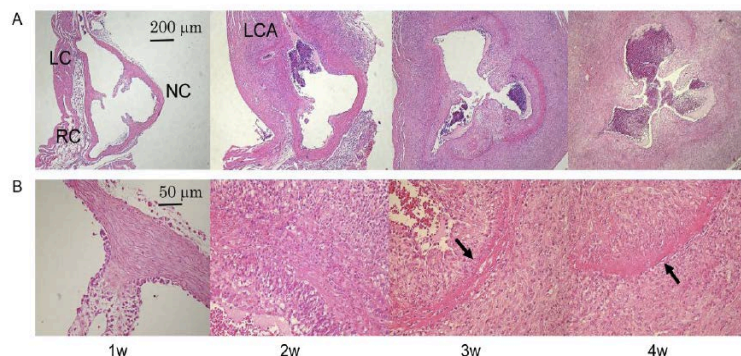


Fig. 1 DBA/2 マウスの CAWS 血管炎で大動脈弁周囲及び冠動脈開口部に認められる血管病変の発症および進展の過程

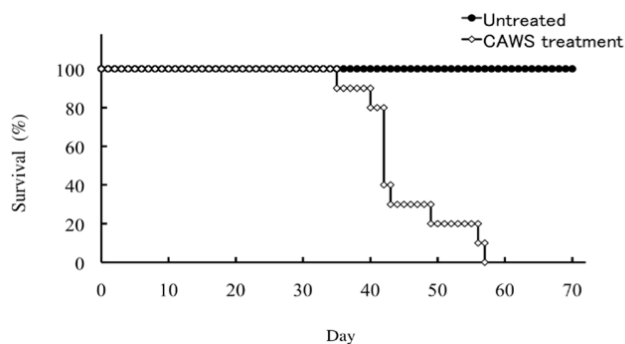


Fig. 2 DBA/2 マウスにおける CAWS 投与後の生存率 (Kaplan-Meier 曲線)

停止したが、DBA/2 マウスの致死毒性は 5～6 週目付近から認められ、その後数週間以内に CAWS 投与群の 100%が死亡した (Fig. 2)。この致死毒性は、CAWS 血管炎を発症する他の系統 (C57Bl/6 や BALB/c など) と比較しても著しく強いいため、DBA/2 マウスに認められる強力な致死毒性は、血管炎のみでは説明が困難であった。マウスが死亡するまでには、血管病変が完成してから更に数週間を要することから、血管病変のため慢性期に何らかの循環器疾患を合併し、心機能異常や不整脈によって突然死した可能性が高いと考えられる。

CAWS 投与後 1 週毎に心血管組織の切片を Hematoxylin and Eosin (HE) 染色し、既報の 100%致死量における心血管病変の病理組織像の経時的変化を観察した。

その結果、DBA/2 マウスでは CAWS 投与後の初期段階から炎症性細胞が集積して血管炎が惹起され、3～4 週間のうちに著しい血管病変が形成された (Fig. 1)。CAWS 血管炎は

単に大動脈病変にとどまらず、重度の冠動脈起始部病変と大動脈弁病変を伴っていた。また、血管病変の膠原線維を Elastica Van Gieson (EVG) で染色すると、中膜弾性板が破壊されており、炎症性細胞の細胞外マトリックス構造への浸潤が観察された。さらに電子顕微鏡を用いた観察によって、顆粒球系細胞が弾性線維を突破して浸潤する様子が観察された。血管病変は CAWS 投与後 4 週程度でその進展はほぼ

第2章 DBA/2 マウスにおける CAWS 血管炎の左室機能低下病態モデルとしての解析

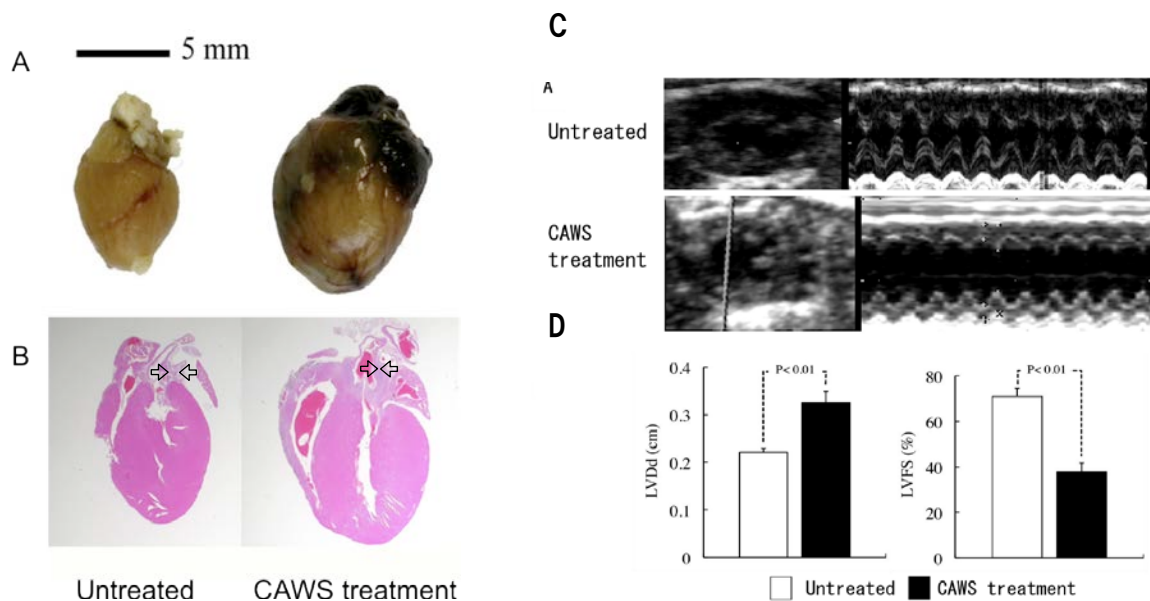


Fig. 3 DBA/2 マウスの CAWS 血管炎で認められる左心肥大と大動脈弁病変および左室機能不全

DBA/2 マウスの CAWS 血管炎では、著しい脾腫とともに心肥大を認める。特に心肥大は大動脈炎や冠動脈炎に伴う心疾患の合併を示唆するものと考えられるため、心臓の構造的・機能的変化に着目した。CAWS 血管炎の大動脈周囲および大動脈弁、および心筋組織の病変部についてさらに詳しく解析すると、炎症性細胞の浸潤は大動脈弁の弁尖肥厚と大動脈弁口の狭小化を来たしており、さらに炎症性細胞の集積により左室流出路 (LVOT) の高度狭窄を生じていることが判明した (Fig. 3-A,B 矢印)。

したがって、CAWS 投与後の心肥大は、大動脈弁狭窄と LVOT 狭窄が主要な原因であり、左室に過剰かつ持続的な圧負荷をかけ続けた結果、左室の求心性心筋肥大を誘導したと考えられた。一方で、死亡直前の心臓超音波エコー検査では、遠心性心筋肥大を伴う著しい左室収縮機能の低下が観察された (Fig. 3-C,D)。これは、CAWS 血管炎の冠動脈病変によって、肥大した左室心筋全体が重篤な虚血に陥り、拡張相様の遠心性左室肥大に移行したと考察される。更に遠心性左室肥大により、急激な左室機能低下を来とし、心不全死あるいは致死的不整脈による突然死が誘発されたのが致死毒性の主要な要因と考えられる。また、心不全の診断に広く臨床応用されている B 型ナトリウム利尿ペプチド (BNP) の mRNA 発現は、CAWS 投与群の心筋細胞において顕著に亢進しており、血管病変に伴う心臓への過負荷が心筋細胞レベルでも確認された。

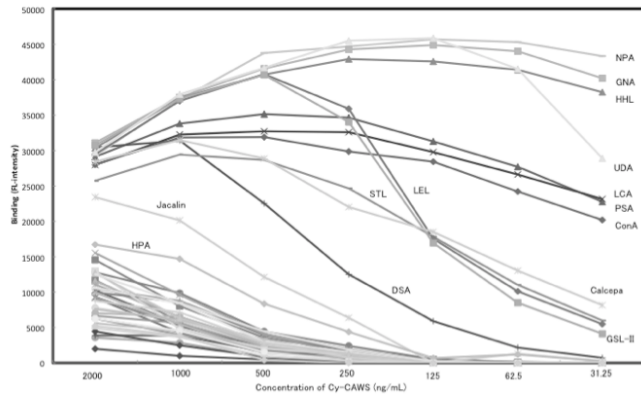


Fig. 4 CAWS の各種レクチンに対する結合活性

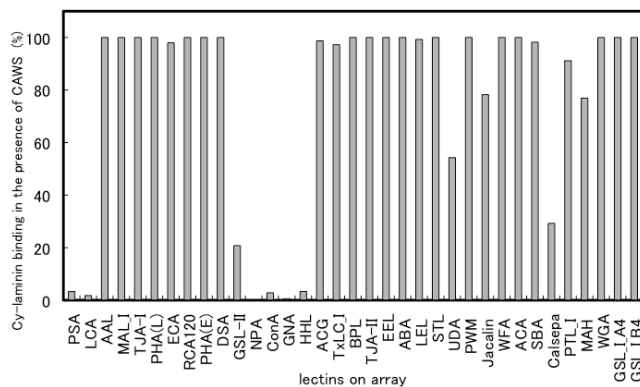


Fig. 5 標識ラミニンと各種レクチンとの結合に対する CAWS の競合活性

CAWS の糖鎖プロファイリングでは、PSA, LCA, NPA, ConA, GNA, HHL, 並びに UDA に強く結合した (Fig. 4)。これらは α マンナンの high-mannose 構造を認識して結合するレクチンであり、CAWS の糖鎖は α -マンノース (Man) を多く含有していることが確認された。さらに、細胞間マトリックスを構成する糖タンパク質であるラミニンに結合した糖鎖と CAWS のレクチン結合における競合作用について検討した。その結果、主に high-mannose タイプの糖鎖を認識するレクチンとの結合で CAWS はラミニンの糖鎖に競合した (Fig. 5)。これらの結果から、CAWS は炎症応答およびリモデリングの過程で、high-mannose タイプの糖鎖を介した相互作用を誘導する可能性があることが示された。

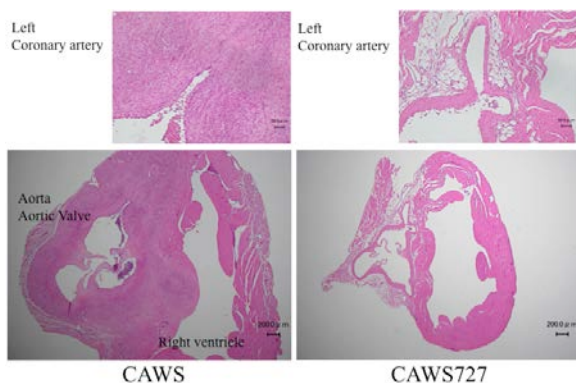


Fig. 6 DBA/2 マウスにおける CAWS および CAWS727 投与後の心血管組織の比較

第3章 CAWS のマンナンを構成する糖鎖構造の解析と血管炎誘発活性の構造活性相関に関する検討

CAWS は、樹状細胞やマクロファージの表面に多く発現している C タイプレクチン様受容体 (CLRs) の dectin-2 に結合し、自然免疫系を活性化させる。Dectin-2 は CAWS の α マンナン構造をリガンドとして認識することが判明している。マンナン構造は動物の結合組織を構成する糖タンパク質にも含まれているため、CAWS の糖鎖と生体成分の構造類似性が自然免疫系を撓乱し、自己抗原に対する反応性が誘導される可能性がある。そこで、CAWS および生体を構成する糖鎖構造を比較するとともに、CAWS の糖鎖構造と活性の相関について検討した。糖鎖構造の解析には、様々な種類のレクチンと糖鎖の結合性を網羅的に解析するレクチンアレイを応用した手法を用いた。

次に、*C. albicans* を種々の条件で培養し、CAWS 様多糖を調製して活性を比較した結果に基づき、pH 7.0, 27°C 条件下で得られた多糖 (CAWS727) について検討した。その結果、CAWS727 では血管病変が認められず (Fig 6)、サイトカイン産生能は弱く、致死毒性は認められなかった。

CAWS と CAWS727 の構造について 2 次

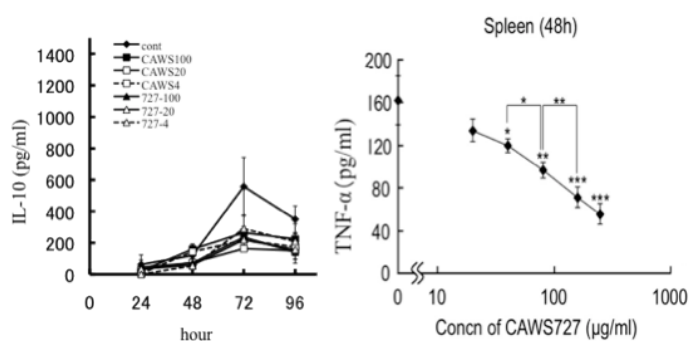


Fig.7 DBA/2 マウス脾臓細胞での IL-10 産生と CAWS727 の CAWS に対する抗炎症活性

制し、かつ血管炎を抑制する cytokine である IL-10 の産生には影響を与えなかった。この結果より CAWS 727 は CAWS の作用に競合するのみでなく、血管炎に対して抗炎症作用を有していることが示唆される (Fig.7)。

総括

本研究は DBA/2 マウスの CAWS 血管炎モデルが急性期の血管炎モデルである (第 1 章) とともに、慢性期には心不全を合併する循環器疾患モデルとしても有用である事を示唆している (第 2 章)。更に CAWS 血管炎の発症には dectin-2 のリガンドである α Man の high-mannose 構造が重要であり、結合組織中の糖タンパク質の high-mannose 構造と交差反応して血管炎が進行する要因になっている可能性を示した。一方で、 β Man の付加により、血管炎誘導活性は著しく減弱し、CAWS の TNF 産生を抑制して抗炎症作用を示すため、血管炎治療薬の開発にも繋がる可能性がある (第 3 章)。CAWS 血管炎は容易な手技で作成が可能であり、血管炎と慢性心不全の合併により一定期間を経てから急激に生存率が低下し、未治療では全例が死亡する。この特徴は血管炎や心不全の治療効果を生存率で比較する場合に極めて有用で、高精度の判定が可能な優れた循環器疾患の動物モデルであると考えられる。

【研究結果の掲載誌】

- 1) *Yakugaku Zasshi*. 126:643–650, 2006.
- 2) *Int J Vasc Med.*, ID: 570297, 2012.
- 3) *医学と生物学*. 157, 123-133, 2013.

元 NMR を用いて解析すると、CAWS727 において α Man シグナルの減弱と β -1,2-Man シグナルの増強が確認された。この傾向はレクチンアレイの解析においても同様であった。Dectin-2 のリガンドである α Man 構造に β -1,2-Man 残基が付加されたことより、CAWS と dectin-2 の親和性が減弱し、活性が低下したと推察される。

また、CAWS 刺激による TNF- α 産生を CAWS727 は濃度依存的に抑

論文審査の結果の要旨

申請論文は、病原性真菌 *Candida albicans* 培養上清から得られる可溶性多糖画分 (*Candida albicans* water soluble fraction; CAWS) の血管炎惹起作用 (CAWS 血管炎) について、DBA/2 系統のマウスで生じる致死的血管炎を用いて解析したものであり、3 章から構成されている。

第 1 章では、CAWS 投与後 1 週毎に心血管組織の切片を作成し、病理組織像の変化を経時的かつ詳細に観察し、この血管炎は大動脈病変にとどまらず、冠動脈起始部と大動脈弁に病変を伴っていることを明らかにした。さらに、致死的血管炎の発症は、血管炎が完成してから数週間を要することから、慢性期の循環器系疾患を合併し、心機能異常や不整脈によって突然死する可能性が高いものと推定した。

第 2 章では、前章において心機能の異常が示唆されたため、心臓の構造的・機能的変化に着目して解析し、炎症性細胞の顕著な浸潤によって大動脈弁の弁尖肥厚と大動脈弁口の狭小化を来とし、さらに炎症性細胞の堆積により左室流出路 (LVOT) の狭窄を生じていることを明らかにした。さらに、心エコー検査によって、遠心性心筋肥大を伴う左室機能低下を生じていること、また、B 型ナトリウム利尿ペプチド (BNP) の mRNA 発現が上昇することも見出し、血管病変を伴う心臓への負荷が心不全を起し致死に至ったものと推定した。

第 3 章では、CAWS の糖鎖は α Man を多く含有していることをレクチンアレイへの結合性から明らかにし、さらに、通常の *Candida* の培養条件に加え、pH 7.0, 27°C に制御した条件下で培養して多糖画分 (CAWS727) を調製し、血管炎の惹起活性や致死毒性について比較検討した。その結果、CAWS727 は殆ど活性を消失しており、構造的には β -1,2-Man 残基が著しく増加していることを明らかにした。また、in vitro 細胞培養系を用い CAWS727 は CAWS による Dectin-2 からの刺激に対してアンタゴニストとして機能することを明らかにした。

これらの実験成績の基づき、本モデルが急性期の血管炎のモデルであるとともに、慢性期の心不全モデルとして有用であることを示唆し、さらに、モデル作成が簡便であることから臨床現場で活用できる点についても言及した。これらの成果は血管炎の発症機構ならびに循環器疾患の治療薬開発にかかわる重要な成績を含むものであり、博士 (薬学) の学位にふさわしいものであると認める。